

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/18, 15/63, C12P 21/02, C07K 14/485, 16/22, G01N 33/50</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/02543</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月22日(22.01.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02456</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月15日(15.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/185216 1996年7月15日(15.07.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-41 茨城県新治郡新治村永井153-2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 平田裕一(HIRATA, Yuichi)[JP/JP] 根津淳一(NEZU, Junichi)[JP/JP] 〒300-41 茨城県新治郡新治村永井153-2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL VEGF-LIKE FACTORS</p> <p>(54)発明の名称 新規なVEGF様因子</p> <p>(57) Abstract A novel human gene having a significant homology with a VEGF-C gene which has been isolated by the PCR method with the use of primers designed on the basis of the sequence of EST assumed to be homologous with the C terminal part of VEGF-C which falls within the VEGF family; mouse and rat genes which have been isolated on the basis of the human gene isolated above; a protein encoded by the above-mentioned human gene which has been isolated by transferring the gene into <i>Escherichia coli</i> and expressing it therein. It is expected that the isolated protein and genes are applicable to, for example, gene therapy for VEGF-D gene coloboma, wound healing and the promotion of collateral vessel formation. Moreover, it is expected that VEGF-D protein inhibitors are usable as novel anticancer drugs, etc.</p>		

Best Available Copy

(57) 要約

VEGFファミリーの一つ、VEGF-CのC末端部分に相同性を有すると推定されるESTの配列を基に設計したプライマーを用いたPCR法により、VEGF-C遺伝子と有意な相同性を有する新規なヒト遺伝子を単離した。また、単離したヒト遺伝子を基にマウス及びラットの遺伝子も単離した。さらにヒト遺伝子を大腸菌に導入して発現させることにより該遺伝子がコードするタンパク質を単離した。単離されたタンパク質および遺伝子は、VEGF-D遺伝子欠損症に対する遺伝子治療、創傷治療、副血行路形成促進などへの応用が期待される。さらにVEGF-Dタンパク質の阻害剤は、新規な抗ガン剤などとして利用されることが期待される。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KR	韓国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LK	スリランカ				

明細書

新規なVEGF様因子

技術分野

本発明は、ヒトの血管形成に関わるタンパク質因子に関し、遺伝子工学などの分野に属する。

背景技術

動物の血管の内壁に存在する内皮細胞が新しい血管を作り出す現象、即ち、血管形成(angiogenesis)の過程は、特異的なシグナルの伝達により引き起こされる。このシグナル伝達には、これまで様々な因子が関与していることが報告されている。その中でも最も注目されている物質が、血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor、以下、「VEGF」と称する。)である。VEGFは、血管内皮細胞の増殖や血管の透過性を亢進させる物質として精製、単離されたタンパク質性因子である(Senger,D.R.et al, Science,219:983-985(1983);Ferrara,N and Henzel,W.J. Biochem.Biophys.Res.Comm.,161:851-858(1989))。ヒトVEGF遺伝子には、8つのエキソンが存在し、そのスプライシングの違いにより、121、165、189、及び206のアミノ酸からなる4種類のサブタイプが形成され、この結果、VEGFが異なる分泌パターンを示すことが報告されている(Houck,K.A.et al. Mol. Endocrinol. 5,1806-1814(1991))。また、VEGFには、特異的な受容体であるflt-1が存在し、VEGFのflt-1への結合が、シグナル伝達に重要であることが報告されている(Vries,C.D.et al. Science,255:989-991(1992))。

VEGFの類縁因子としては、これまでにPlGF(Placental growth factor)やPDGF(Platelet-Derived Growth Factor)が単離されており、血管内皮細胞に対し、増殖促進活性を有することが示されている(Maglione, D. et al. Proc. Natl. Acad.

Sci. U.S.A. 88, 9267-9271(1991); Betsholtz, C. et al. Nature 320, 695-699(1986)). さらに最近になって、VEGF-B(Olofsson, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2576-2581(1996))、及びVEGF-C(Lee, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1988-1992(1996)); Joukov, V. et al. EMBO J. 15, 290-298(1996))が単離された。

これら因子は一つのファミリーを形成していると考えられ、上記以外の未知な因子をそのメンバーとして含んでいる可能性も想起される。

VEGFについては、発生段階における血管形成の役割ばかりでなく、糖尿病、リウマチ様関節炎、網膜症、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生にも関与していることが示唆されている。さらに上記血管内皮細胞増殖促進効果に加えてVEGFの持つ血管透過性亢進作用は各種原因に由来する浮腫の形成に関与していることが示唆されている。また、これらのVEGFファミリーは血管のみでなく、血液細胞やリンパ管にも作用し血液細胞の分化増殖やリンパ管の形成にも関与していることが示唆されている。従って、現在、VEGFファミリーは、有用な新薬開発のターゲットとして非常に注目されている。

発明の開示

本発明は、VEGFファミリーに属する新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者等は、最近クローニングされたVEGFファミリーの一つ、VEGF-Cとホモロジーを持った遺伝子の検索をGenBankデータベース中のEST(Expressed sequence tag)及びSTS(Sequence tagged sites)に対して行った。その結果、VEGF-CのC末端部分にホモロジーを有すると推定されるESTを見いだした。次いで、この配列を基にプライマーを設計し、5' RACE法、及び3' RACE法で該当するcDNAを増幅し、単離した。単離したcDNAの塩基配列を決定し、これを基に推定アミノ酸配列を決定したところ、該アミノ酸配列は、全体に渡って、VEGF-Cのアミノ酸配列と有意な相同性を有する

ことが判明した。その相同性から、本発明者等は、単離したヒトクローンがVEGFファミリーに属する4番目のメンバー(以下、「VEGF-D」と称する)であると考えた。また、本発明者等は、単離したヒトVEGF-D遺伝子がコードするタンパク質を大腸菌内で発現させ、これを精製し単離することに成功した。さらに本発明者等は、単離したヒトVEGF-D遺伝子を基にマウスおよびラットのVEGF-D遺伝子を単離することにも成功した。

即ち、本発明は、VEGFファミリーに属する新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質、
 - (2) 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質、
 - (3) (1)に記載のタンパク質をコードするDNA、
 - (4) 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNA、
 - (5) (3)または(4)に記載のDNAを含むベクター、
 - (6) (5)に記載のベクターを保持する形質転換体、
 - (7) (6)に記載の形質転換体を培養することを特徴とする、(1)または(2)に記載のタンパク質の生産方法、
 - (8) (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する抗体、
 - (9) (1)または(2)に記載のタンパク質と被検サンプルとの結合活性を検出する工程を含む、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法、
 - (10) (9)に記載の方法により単離される、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合する化合物、
- に関する。

本発明のタンパク質 (VEGF-D) は、VEGF-Cに対し有意な相同性を有しており、VEGFファミリーの第4番目の因子であると考えられる。VEGFは、発生段階における血管形成を主要な機能とし、その他、糖尿病、リウマチ様関節炎、網膜症、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生等にも関与していることが考えられており、本発明のタンパク質も同様の機能を担っていると考えられる。

当業者であれば、公知の方法により、配列番号：1に記載のVEGF-Dのアミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸を付加、欠失、置換して、本発明のVEGF-Dに改変を加え、機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、タンパク質の改変はこのような人工的な改変以外に、天然においても生じうる。このような改変タンパク質もまた本発明の目的である。アミノ酸の付加、欠失、置換のための公知の方法としては、例えば、OE-PCR (overlap extension polymerase chain reaction) 法 (Gene 1989 77(1) p51) などの方法が挙げられる。

また、本発明のVEGF-Dをコードする配列番号：2に記載のDNAは、他の生物においてVEGF-Dと同様の機能を有するタンパク質をコードするDNAの単離に用いられる。例えば、当業者であれば、配列番号：2に記載のDNA配列もしくはその一部をプローブとして、他の生物由来のDNAに対しハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明のヒトVEGF-Dのホモログを他の生物から単離することは、通常行いうることである。従って、配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAもまた本発明の目的である。他の生物としては、例えば、マウス、ラット、うさぎなどが挙げられる。

VEGF-Dと機能的に同等なタンパク質をコードするDNAは、配列番号：2に記載のDNAと通常高い相同性を有する。ここで高い相同性とは、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の配列の同一性を指す。

高い相同性を有するDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の一例を示せば、以下の如くである。即ち、ExpressHyb Solutionで68℃で30分間プレハイブリダイゼーションをおこなう。ラジオアイソトープラベルしたプローブを95℃

～100℃で2～5分間変成し、氷上で急冷する。新しいExpressHyb Solutionにプローブを加える。プローブを含む溶液に入れ替え、68℃～55℃の温度グラジエント条件で2時間ハイブリダイゼーションを行う。室温の2xSSC、0.05% SDS溶液で10分間ずつ、4回洗浄する。45℃の0.1xSSC、0.1% SDS溶液で3分間洗浄する。オートラジオグラフィーを取る。

さらに、非常に高い相同性を有するDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の一例を示せば、以下の如くである。即ち、ExpressHyb Solutionで68℃で30分間プレハイブリダイゼーションをおこなう。ラジオアイソトープラベルしたプローブを95℃～100℃で2～5分間変成し、氷上で急冷する。新しいExpressHyb Solutionにプローブを加える。プローブを含む溶液に入れ替え、68℃で1時間ハイブリダイゼーションを行う。室温の2×SSC、0.05% SDS溶液で10分間ずつ、4回洗浄する。50℃の0.1×SSC、0.1% SDS溶液で40分間、途中1回溶液を取り替えながら洗浄する。オートラジオグラフィーを取る。

但し、ハイブリダイゼーションの条件は、用いるプローブの長さ（オリゴマーか、数百ベース以上のプローブか）やラベルの方法（ラジオアイソトープラベルしたプローブか非ラジオアイソトープラベルのプローブ）、また、クローニングしようとする目的の遺伝子の種類によっても変動しうる。当業者であれば、好適なハイブリダイゼーションの条件を適宜選択することが可能である。本発明においては、特に、VEGF-CをコードするDNAとハイブリダイズしない条件であることが好ましい。

本発明のDNAは、また、本発明のVEGF-Dを組み換えタンパク質として生産するために用いられる。即ち、VEGF-DをコードするDNA（例えば、配列番号：2に記載のDNA）を適当な発現ベクターに組み込み、このベクターを宿主に導入し、該形質転換体を培養し組み換えタンパク質を発現させることにより、組み換えタンパク質を大量に生産することができる。

組み換えタンパク質の生産に用いられるベクターとしては、特に制限はないが、

pGEMEX-1(Promega社製)、pEF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990 18(17) p5322) などのベクターが好適に用いられる。また、ベクターの導入される宿主としては、大腸菌、CHO細胞、COS細胞などが好適に用いられる。

形質転換体に発現させたVEGF-Dタンパク質は、例えば、ホモジェナイザー、超音波細胞破碎などによる可溶化処理、各種緩衝液による抽出処理、酸またはアルカリによる可溶化もしくは沈殿処理、更には有機溶媒による抽出もしくは沈殿処理、硫酸などによる塩析、透析、メンブレンフィルターなどを用いた限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動もしくはゲル電気泳動、抗体や受容体等を固定化したアフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせることで精製を行うことが可能である。

組み換えタンパク質が得られれば、公知の方法により抗体を調製できる。公知の方法としては、精製後の該タンパク質をウサギや羊等に免疫してポリクロナール抗体を作製する方法や、マウスやラットに免疫してその抗体産生細胞からモノクロナール抗体を作製する方法等が挙げられる。得られた抗体を用いてVEGFの定量が可能となる。また得られた抗体は、直接用いることも可能であるが、免疫原性を低下させるため、ヒト型化した後に用いると有効である。ここで、抗体をヒト型化する方法としては、モノクロナール抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法や、免疫系をヒトのものに入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクロナール抗体と同様に直接ヒト抗体を作製する方法などが挙げられる。得られたVEGF-Dタンパク質又はその抗体は、皮下注射などの方法により、体内に投与することが可能である。

また、当業者であれば公知の技術を用いて本発明のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングすることも可能である。

例えば、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞（例えば、哺乳動物の肺、小腸、心臓の細胞）よりファージベクター（

λgt11, ZAPなど)を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタンパク質をビオチンラベル、あるいはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているブランクを、ストレプトアビジン、あるいは抗GST抗体により検出する「ウエストウエスタンブロットイング法」(Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991)Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90)により調製することが可能である。また、本発明のタンパク質をSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離して大腸菌に導入して発現させる(酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)「twoハイブリッドシステム」(「MATCHMARKER Two-Hybrid System」,「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」,「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもclontech社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」)に従い調製することも可能である。また、本発明のタンパク質に結合する物質、例えば、受容体などが発現していることが予想される細胞(例えば、血管内皮細胞、骨髄細胞もしくはリンパ管細胞など)から構築した発現cDNAライブラリーをCOSなどの細胞に導入し、本発明のタンパク質そのもの、または放射性物質もしくは蛍光物質で標識したものをい

て、本発明のタンパク質が結合することを検出し、結合タンパク質をクローニングする方法 (Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T (1988) Cloning and expression of human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta2) receptor. Science, 241:825-828、Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S (1990) Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. Cell, 61, 341-350) により調製することも可能である。さらに、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。なお、得られたタンパク質のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のタンパク質と結合するタンパク質をコードするDNAを得ることも可能である。

また、固定した本発明のタンパク質に、化合物、または天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64、Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13、Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) により本発明のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングすることも可能である。

本発明のVEGF-Dの利用法としては、さらに、VEGF-D遺伝子をVEGF-D遺伝子欠損症患者の体内に導入したり、また体内で発現させるなどして遺伝子治療に用いること

が考えられる。一方、該遺伝子のアンチセンスを用いて、該遺伝子の自体の発現を阻害し、病的血管新生を抑制することも考えられる。

VEGF-D遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスを体内に導入する方法としては、種々の方法が考えられるが、例えば、レトロウイルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウイルス法などが、好適に用いられる。

また、これら遺伝子を体内で発現させるためには、該遺伝子を適当なベクターに組み込み、上記のレトロウイルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウイルス法などによって、体内に導入する方法が考えられる。用いられるベクターには、特に制限はないが、pAdexlcwやpZIPneoなどのベクターが好適である。

また、VEGF-D遺伝子の塩基配列異常を検出するPCRなどによりVEGF-D遺伝子の異常による疾患の診断への応用が考えられる。

さらなる本発明の利用法としては、VEGF-Dタンパク質の血管形成作用を利用して、VEGF-Dタンパク質やそのアゴニストを創傷治療、副血行路形成促進、あるいは造血幹細胞の造血支持に応用することや、VEGF-Dタンパク質の抗体やアンタゴニストを病的血管新生、リンパ管形成異常や造血異常などの治療剤、あるいは各種原因に由来する浮腫の治療剤として利用することも考えられる。またVEGF-Dの抗体を用いた定量法により、VEGF-D産生異常による疾患の診断に応用することも考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、VEGF-D遺伝子、各EST配列、及びクローニングに用いたプライマーの関係を示す図である。

図2は、EST (H24828) とVEGF-Cとのアミノ酸配列の比較を示す図である。

図3は、VEGF-D遺伝子と、これまでに報告されたVEGFファミリーを構成する遺伝子とのアミノ酸配列の比較を示す図である。

図4aは、VEGF-Dの疎水性プロットを示す図である。図4bは、VEGF-Dのシグナル

ペプチド切断点の予想を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] TFASTA法によるホモロジー検索

VEGF-CのC末端側に存在する「BR3P(Balbani ring 3 protein)リピート」に見られるコンセンサス配列を基に「CGPNKELDENTCQCVC (配列番号:3)」という配列を設計し、Genbankデータベース(1996年2月29日現在)中の全EST及びSTS配列をTFASTA法(Pearson and Lipman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448(1988))で検索した。検索条件は以下のものを用いた(表1)。

表 1

Sequences:	392,210
Symbols:	135,585,305
Word Size:	2
Gap creation penalty:	12.0
Gap extension penalty:	4.0

この結果、このコンセンサス配列をコードすると考えられるEST(Accession No .H24828)を見いだした。この配列は「The WashU-Merck EST Project」によって登録されたESTの一つであり、検索に用いた16アミノ酸中9個が一致していた。この配列を基にさらにNCBIの「UniGene」による検索を行うと、同一遺伝子由来のESTと考えられる配列が、このESTを含め全部で5個 [T64149, H24780, H24633, H248

28, T64277 (1996.3.1現在)] 登録されていることが判明した。このうち、T64277とT64149、H24828とH24780はそれぞれ同一クローンの5' 配列と3' 配列の組合せであり、そのクローンのインサートサイズはどちらも約0.9kbであった (図1)。

H24828の配列をホモロジーの見つかったフレームでタンパク質配列に翻訳すると、C末端の104アミノ酸をコードしていることが予想された。このアミノ酸配列をVEGF-Cの配列と並べてみると104アミノ酸中28個のアミノ酸が一致しており (27%)、しかもシステインやプロリン等タンパク質の構造保持に重要なアミノ酸がよく保存されていた (図2)。なお、保存された配列を白抜きで示した。

[実施例2] ライブラリーからのcDNAのクローニング

検索により見いだしたEST(H24828)の配列を基に5' RACE用のプライマー及び3' RACE用のプライマー(5' RACE用: 5'-AGGGATGGGGAACTTGAACGCTGAAT-3' (配列番号:4)、3' RACE用: 5'-GATCTAATCCAGCACCCCAAAACTGC-3' (配列番号:5))を設計した (図1)。ヒト肺由来のポリA⁺RNAから逆転写酵素を用いて、二本鎖cDNAを合成し、さらに、その両末端にアダプターcDNAを結合させたcDNAである「Marathon-Ready cDNA, Lung (Clontech社製)」を鋳型とし、上記プライマー及びアダプタープライマーであるAP-1プライマー (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (配列番号:6)) (図1)を用いて、PCRを行った。なお、上記アダプターcDNA内には、アダプタープライマーAP-1及びAP-2がハイブリダイズする領域が存在する。PCRは、94°Cで1分の処理後、94°Cで30秒、72°Cで4分の処理を5サイクル、次いで、94°Cで30秒、70°Cで4分の処理を5サイクル、さらに、94°Cで20秒、68°Cで4分の処理を25サイクルの条件で行った。[ただし、Taqポリメラーゼとして、「Advantage KlenTaq Polymerase Mix」の代わりに、「TaKaRa Ex Taq」(宝酒造製)及び添付のバッファーを用いた。] この結果、5'側と3'側の、それぞれ1.5Kb、0.9Kbの断片が増幅された。これら断片を、「pCR-Direct Cloning System (Clontech社製)」、「pCR-TRAP Cloning System (GenHunter社製)」、及び「PT7Blue-T vector (Novagen社製)」を用いて、それぞれクローニングした。なお、5' RACE断片を「pCR-Di

rect vector」にクローニングする際には、「5'-CTGGTTCGGCCAGAACTTGGAACGCTGAATCA-3' (配列番号:7)」、及び「5'-CTCGCTCGCCCACTAATACGACTCACTATAGG-3' (配列番号:8)」をプライマーとして用い、再増幅を行った。

[実施例3] 塩基配列の解析

「ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Amplitaq DNA Polymerase FS」及び「377 A DNA Sequencer (ABI社製)」を用いてDNA配列を決定した。なお、プライマーには、ベクター内のプライマー (5'-AATTAAACCCTCACTAAAGGG-3' (配列番号:9)、5'-CCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3' (配列番号:10))及び、AP-2プライマー(5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (配列番号:11))、さらに以下の10種類の配列内プライマーを用いた (表2)。

表2

SQ1(配列番号:12)	5'-AAGTCTGGAGACCTGCT-3'
SQ2(配列番号:13)	5'-CAGCAGGTCTCCAGACT-3'
SQ3(配列番号:14)	5'-CGCACCCAAGGAATGGA-3'
SQ4(配列番号:15)	5'-TGACACCTGGCCATTCCA-3'
SQ5(配列番号:16)	5'-CATCAGATGGTAGTTCAT-3'
SQ6(配列番号:17)	5'-ATGCTGAGCGAGAGTCCATA-3'
SQ7(配列番号:18)	5'-CACTAGGTTTGGCGCAACTT-3'
SQ8(配列番号:19)	5'-GCTGTTGGCAAGCACTTACA-3'
SQ9(配列番号:20)	5'-GATCCATCCAGATCCCTGAA-3'
SQ10(配列番号:21)	5'-CAGATCAGGGCTGCTTCTA-3'

クローニングした5'側の約1.5kbの断片と3'側の約0.9kbの断片の塩基配列を決

定したところ、その重なり部分の塩基配列が一致したことから、目的の遺伝子の5'側と3'側のcDNAが確かに得られたことが判明した。該cDNAの全塩基配列を決定したところ、この新規遺伝子は全長約2kbで、354アミノ酸から成るタンパク質をコードしうる遺伝子であった（配列番号：1及び配列番号：2）。Genbankデータベースに登録されていた各EST配列との関係を図1に示す。他のVEGFファミリーとアミノ酸配列を比較すると、ファミリータンパク質間でよく保存されているアミノ酸はこの新規遺伝子中でも保存されており、この遺伝子がVEGFファミリーに属する新規遺伝子であることが明らかとなった（図3）。なお、図3中の「HSVEGF」は、ヒトの「VEGF」を指し、「HSVEGF-D」、「HSVEGF-C」、「HSVEGF-B」は、ヒトVEGFのホモログであるヒト「VEGF-D」、ヒト「VEGF-C」、ヒト「VEGF-B」をそれぞれ指す。さらに、「HSPDGF-A」はヒトの「PDGF-A」、「HSPDGF-B」はヒトの「PDGF-B」、「HSP1GF2」はヒトの「P1GF2」をそれぞれ指す。また、保存された配列を白抜きで示した。VEGF-Dは、中でもFlt4リガンドとしてクローニングされたVEGF-Cと高いホモロジーを示していることから、Flt4と似たレセプターに対するリガンドであると推定された。

疎水性プロット（図4a）、及びvon Heijneの方法(von Heijne G, Nucleic Acids Res. 14, 4683-4690(1986))でシグナルペプチド切断点を予想すると（図4b）、N末端から21アミノ酸はシグナルペプチドとして切断されると考えられるが、VEGF-Cと同様にさらなるプロセッシングを受ける可能性もあると考えられる。

〔実施例4〕 ノーザンプロット解析

「pCR-Direct vector」中にサブクローニングされた5'側断片より、EcoRVによって切り出される約1kbpの断片を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPにより標識し、プローブとして用いた。標識は「Ready-to Go DNA labelling beads(Pharmacia社製)」を用いたランダムプライマー法により行った。「Multiple Tissue Northern(MTN) Blot-Human」、「Human II」、「Human Fetal」、及び「Human Cell line」(Clontech社製)を用い、「ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech社製)」中で常法

に従ってハイブリダイゼーションを行った。この結果、肺、心臓、小腸で強く発現しているのが認められた。また、骨格筋、卵巣、結腸、及び脾臓でも弱く発現していた。なお、mRNAの見かけの分子量は約2.2kbであり、今回クローニングした遺伝子はほぼ全長に近いものであると考えられた。

【実施例5】 大腸菌によるVEGF-Dタンパク質の発現

2つのプライマー「5'-TCCAGATCTTTTGGCGCACTTTCTATGACAT-3' (配列番号:22)」
、「5'-CAGGTCTGACTCAAACAGGCACTAATTCAGGTAC-3' (配列番号:23)」を合成し、ヒトVEGF cDNAのアミノ酸89番目から181番目に相当する領域を増幅した。得られたDNA断片を制限酵素BglIIとSalIで処理し、制限酵素BamHIとSalIで処理したプラスミドpQE42 (QIAGEN社製) と「ligation kit II」 (宝酒造社製) を用いて結合した。得られたプラスミドを大腸菌SG19003[pREP4] (QIAGEN社製) に導入し、変異を含まず予定どおり完成したプラスミド (pQE42-BS3) を選択した。プラスミドpQE42-BS3を大腸菌BL21 (Invitrogen社製) に導入し、100mg/lのピクシリン (注射用アンピシリンナトリウム、明治製菓社製) を含むL Brothで10ml培養し、それを新しいL Broth 200mlに植菌した。37°Cで1.5時間培養後、IPTGを3mMとなるように培地を加えてさらに37°Cで5時間培養した。集菌した後、「QIAexpress TypeII kit」のプロトコールに従い、Ni-NTAカラムでタンパク質を精製した。

【実施例6】 大腸菌によるDHFR-VEGF-D融合タンパク質の発現

ヒトVEGF cDNAのアミノ酸89番目から181番目に相当する領域を実施例5と同じプライマーで増幅した。得られたDNA断片を制限酵素BglIとSalIで処理し、制限酵素BamHIとSalIで処理したプラスミドpQE40 (QIAGEN社製) と「ligation kit II」 (宝酒造社製) を用いて結合した。得られたプラスミドを大腸菌SG19003[pREP4] (QIAGEN社製) に導入し、変異を含まず予定どおり完成したプラスミド (pQE40-BS3) を選択した。プラスミドpQE40-BS3を大腸菌BL21 (Invitrogen社製) に導入し、100mg/lのピクシリン (注射用アンピシリンナトリウム、明治製菓社製) を含むL Brothで10ml培養し、それを新しいL Broth 200mlに植菌した。37°Cで1.5時間培

養後、IPTGを3mMとなるように培地を加えてさらに37°Cで5時間培養した。集菌した後、「QIAexpress TypeII kit」のプロトコールに従い、Ni-NTAカラムでDHFR-VEGF-D融合タンパク質を精製した。

【実施例7】 マウスVEGF-D cDNAのクローニング

「Mouse lung 5'-stretch cDNA library」(Clontech社製)を 1.5×10^6 pfu転写した「Hybond-N+」(Amersham社製)フィルター(20cm×22cm)を2枚作製した。約50ngのhuman VEGF-DのPvuII断片を「Ready-To-Go DNA Labelling Beads(-dCTP)」(Pharmacia社製)で $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP(Amersham社製)で標識したものをプローブとして「ExpressHyb Hybridization Solution」(Clontech社製)を用い68°Cから55°Cへのグラジエントハイブリダイゼーションを2時間行った。2xSSC、0.05% SDSを用い室温で10分間4回フィルターを洗浄した後0.1xSSC、0.1% SDSを用い45°Cで3分間洗浄した。「HyperFilm MP」(Amersham社製)と増感紙を用いフィルターを-80度で一晩露光した。ポジティブクローンは同様に二度目のスクリーニングを行い単一クローンに単離した。単離したラムダDNAはプレートライセートから「QIAGEN Lambda MAX I Kit」(Qiagen社製)を用いて精製した。インサートDNAをEcoRIで切り出しpUC118 EcoRI/BAP (Takara社製)にサブクローニングした後ABI377シーケンサー(Perkin Elmer社製)により配列を決定した。得られたクローンのうち重複する2個のクローンからマウスVEGF-Dの全長をコードするcDNAを再構成した。マウスVEGF-D cDNAの塩基配列及び推定アミノ酸配列を配列番号:24に示す。

【実施例8】 ラットVEGF-D cDNAのクローニング

「Rat lung lambda ZAP II vector」(Stratagene社製)を 1.5×10^6 pfu転写した「Hybond-N+」(Amersham社製)フィルター(20cm×22cm)を2枚作製した。約1 μ gのmouse VEGF-D cDNAの1-782bp断片を「Ready-To-Go DNA Labelling Beads(-dCTP)」(Pharmacia社製)で $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP(Amersham社製)で標識したものをプローブとして「ExpressHyb Hybridization Solution」(Clontech社製)を用い68°Cから55°Cへのグラジエントハイブリダイゼーションを2時間行った。2xSSC、0.05% SDSを用い室

温で10分間4回フィルターを洗浄した後0.1xSSC、0.1% SDSを用い45°Cで5分間洗浄した。「HyperFilm MP」(Amersham社製)と増感紙を用いフィルターを-80度で一晩露光した。ポジティブクローンは同様に二度目のスクリーニングを行い単一クローンに単離した。単離したポジティブクローンはE.coli SOLAR(Stratagene社製)とヘルパーファージExAssist(Stratagene社製)を用いてpBluescriptへ切り出した後ABI377シーケンサー(Perkin Elmer社製)により塩基配列を決定した。その結果、ラットVEGF-D cDNAと考えられる配列ではあったが、終始コドンまで含まれていなかった。

そこで、クローニングできなかったC末端部分のcDNAを得るために「Marathon-Ready rat kidney cDNA」(Clontech社製)をテンプレートにし5'プライマー「GCT GCGAGTGTGTCTGTAAA(配列番号:26)」と3'プライマー「GGGTAGTGGGCAACAGTGACAGCA A(配列番号:27)」を用いて94°C15秒、55°C30秒、72°C2分を40回繰り返すPCRをした。得られた断片をpGEM-T vector(promega社製)にサブクローニングした後、ABI 377シーケンサー(Perkin Elmer社製)により配列を決定した。その結果、ラットVEGF-DのC末端部分を含むクローンであった。ブランクハイブリダイゼーションで得たクローンとPCRで得たクローンの結果からラットVEGF-Dの全長を決定した。決定した塩基配列および推定アミノ酸配列を配列番号:25に示す。

産業上の利用可能性

本発明により、VEGF-Cと有意な相同性を有する新規なタンパク質(VEGF-D)およびその遺伝子が単離された。VEGF-Dは、発生段階における正常な血管新生だけでなく、糖尿病、リウマチ様関節炎、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生、さらに血液細胞の分化増殖やリンパ管の形成、あるいは各種原因に由来する浮腫の形成にも関与していると考えられる。本発明の遺伝子は、VEGF-D遺伝子異常疾患の診断や、VEGF-D遺伝子欠損症に対する遺伝子治療に用いることが可能であり、また本発明の遺伝子を発現させて得られるVEGF-Dタンパク質は、創傷治

癒、副血行路形成促進、さらには造血幹細胞の増殖支持などに、また、VEGF-Dタンパク質に対する抗体や阻害剤は炎症に伴う血管形成異常、リンパ管形成異常などに対する治療、各種原因に由来する浮腫の治療、造血異常に対する治療や新規な抗ガン剤として病的血管新生の治療剤に応用することが期待される。またVEGF-Dタンパク質およびその抗体はVEGF-D産生異常による疾患の診断への利用も期待される。

配列表

- (1) 出願人氏名又は名称： 株式会社中外分子医学研究所
(2) 発明の名称： 新規な V E G F 様因子
(3) 整理番号： C 1 - 8 0 2 P C T
(4) 出願番号：
(5) 出願日：
(6) 優先権のもとになった出願をした国名及び出願の番号：
日本国 平成 8 年特許願第 1 8 5 2 1 6 号
(7) 優先日： 1 9 9 6 年 7 月 1 5 日
(8) 配列の数： 2 7

配列番号： 1

配列の長さ： 354

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： タンパク質

起源

生物名： ヒト(Homo sapiens)

組織の種類： 肺(lung)

配列

Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val

1

5

10

15

Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser

20

25

30

Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser

35	40	45	
Ser	Leu	Glu	Glu
Leu	Leu	Arg	Ile
Thr	His	Ser	Glu
Asp	Trp	Lys	Leu
50	55	60	
Trp	Arg	Cys	Arg
Leu	Arg	Leu	Lys
Ser	Phe	Thr	Ser
Met	Asp	Ser	Arg
65	70	75	80
Ser	Ala	Ser	His
Arg	Ser	Thr	Arg
Phe	Ala	Ala	Thr
Phe	Tyr	Asp	Ile
85	90	95	
Glu	Thr	Leu	Lys
Val	Ile	Asp	Glu
Glu	Trp	Gln	Arg
Thr	Gln	Cys	Ser
100	105	110	
Pro	Arg	Glu	Thr
Cys	Val	Glu	Val
Ala	Ser	Glu	Leu
Gly	Lys	Ser	Thr
115	120	125	
Asn	Thr	Phe	Phe
Lys	Pro	Pro	Cys
Val	Asn	Val	Phe
Arg	Cys	Gly	Gly
130	135	140	
Cys	Cys	Asn	Glu
Glu	Ser	Leu	Ile
Cys	Met	Asn	Thr
Ser	Thr	Ser	Tyr
145	150	155	160
Ile	Ser	Lys	Gln
Leu	Phe	Glu	Ile
Ser	Val	Pro	Leu
Thr	Ser	Val	Pro
165	170	175	
Glu	Leu	Val	Pro
Val	Lys	Val	Ala
Asn	His	Thr	Gly
Cys	Lys	Cys	Leu
180	185	190	
Pro	Thr	Ala	Pro
Arg	His	Pro	Tyr
Ser	Ile	Ile	Arg
Arg	Ser	Ile	Gln
195	200	205	
Ile	Pro	Glu	Glu
Asp	Arg	Cys	Ser
His	Ser	Lys	Lys
Leu	Cys	Pro	Ile
210	215	220	
Asp	Met	Leu	Trp
Asp	Ser	Asn	Lys
Cys	Lys	Cys	Val
Leu	Gln	Glu	Glu
225	230	235	240
Asn	Pro	Leu	Ala
Gly	Thr	Glu	Asp
His	Ser	His	Leu
Gln	Glu	Pro	Ala

245 250 255
Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
260 265 270
Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
275 280 285
Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
290 295 300
Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
305 310 315 320
His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
325 330 335
Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
340 345 350
Asn Pro

配列番号 : 2

配列の長さ : 2004

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト(Homo sapiens)

組織の種類 : 肺(lung)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 403 .. 1464

特徴を決定した方法 : E

配列

CCAGCTTTCT GTARCTGTAA GCATTGGTGG CCACACCACC TCCTTACAAA GCAACTAGAA 60
 CCTGCGGCAT ACATTGGAGA GATTTTTTTA ATTTTCTGGA CAYGAAGTAA ATTTAGAGTG 120
 CTTTCYAATT TCAGGTAGAA GACATGTCCA CCTTCTGATT ATTTTGGAG AACATTTTGA 180
 TTTTTTTCAT CTCTCTCTCC CCACCCCTAA GATTGTGCAA AAAAAGCGTA CCTTGCCTAA 240
 TTGAAATAAT TTCATTGGAT TTTGATCAGA ACTGATCATT TGGTTTTCTG TGTGAAGTTT 300
 TGAGGTTTCA AACTTTCCTT CTGGAGAATG CCTTTTGAAA CAATTTTCTC TAGCTGCCTG 360
 ATGTCAACTG CTTAGTAATC AGTGGATATT GAAATATTCA AA ATG TAC AGA GAG 414

Met Tyr Arg Glu

1

TGG GTA GTG GTG AAT GTT TTC ATG ATG TTG TAC GTC CAG CTG GTG CAG 462
 Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val Gln Leu Val Gln
 5 10 15 20

GGC TCC AGT AAT GAA CAT GGA CCA GTG AAG CGA TCA TCT CAG TCC ACA 510
 Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln Ser Thr
 25 30 35

TTG GAA CGA TCT GAA CAG CAG ATC AGG GCT GCT TCT AGT TTG GAG GAA 558
 Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu Glu Glu
 40 45 50

CTA CTT CGA ATT ACT CAC TCT GAG GAC TGG AAG CTG TGG AGA TGC AGG 606
 Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg Cys Arg
 55 60 65

CTG AGG CTC AAA AGT TTT ACC AGT ATG GAC TCT CGC TCA GCA TCC CAT 654
 Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala Ser His

70	75	80	
CGG TCC ACT AGG TTT GCG GCA ACT TTC TAT GAC ATT GAA ACA CTA AAA			702
Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu Thr Leu Lys			
85	90	95	100
GTT ATA GAT GAA GAA TGG CAA AGA ACT CAG TGC AGC CCT AGA GAA ACG			750
Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg Glu Thr			
105	110	115	
TGC GTG GAG GTG GCC AGT GAG CTG GGG AAG AGT ACC AAC ACA TTC TTC			798
Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn Thr Phe Phe			
120	125	130	
AAG CCC CCT TGT GTG AAC GTG TTC CGA TGT GGT GGC TGT TGC AAT GAA			846
Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Glu			
135	140	145	
GAG AGC CTT ATC TGT ATG AAC ACC AGC ACC TCG TAC ATT TCC AAA CAG			894
Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser Lys Gln			
150	155	160	
CTC TTT GAG ATA TCA GTG CCT TTG ACA TCA GTA CCT GAA TTA GTG CCT			942
Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu Val Pro			
165	170	175	180
GTT AAA GTT GCC AAT CAT ACA GGT TGT AAG TGC TTG CCA ACA GCC CCC			990
Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr Ala Pro			
185	190	195	
CGC CAT CCA TAC TCA ATT ATC AGA AGA TCC ATC CAG ATC CCT GAA GAA			1038
Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu			
200	205	210	
GAT CGC TGT TCC CAT TCC AAG AAA CTC TGT CCT ATT GAC ATG CTA TGG			1086

Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met Leu Trp	
215 220 225	
GAT AGC AAC AAA TGT AAA TGT GTT TTG CAG GAG GAA AAT CCA CTT GCT	1134
Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro Leu Ala	
230 235 240	
GGA ACA GAA GAC CAC TCT CAT CTC CAG GAA CCA GCT CTC TGT GGG CCA	1182
Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys Gly Pro	
245 250 255 260	
CAC ATG ATG TTT GAC GAA GAT CGT TGC GAG TGT GTC TGT AAA ACA CCA	1230
His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys Thr Pro	
265 270 275	
TGT CCC AAA GAT CTA ATC CAG CAC CCC AAA AAC TGC AGT TGC TTT GAG	1278
Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys Phe Glu	
280 285 290	
TGC AAA GAA AGT CTG GAG ACC TGC TGC CAG AAG CAC AAG CTA TTT CAC	1326
Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu Phe His	
295 300 305	
CCA GAC ACC TGC AGC TGT GAG GAC AGA TGC CCC TTT CAT ACC AGA CCA	1374
Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr Arg Pro	
310 315 320	
TGT GCA AGT GGC AAA ACA GCA TGT GCA AAG CAT TGC CGC TTT CCA AAG	1422
Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe Pro Lys	
325 330 335 340	
GAG AAA AGG GCT GCC CAG GGG CCC CAC AGC CGA AAG AAT CCT	1464
Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro	
345 350	

TGATTCAGCG TTCCAAGTTC CCCATCCCTG TCATTTTAA CAGCATGCTG CTTTGCCAAG 1524
 TTGCTGTCAC TGTTTTTTC CCAGGTGTTA AAAAAAAT CCATTTTACA CAGCACCACA 1584
 GTGAATCCAG ACCAACCTTC CATTACACC AGCTAAGGAG TCCCTGGTTC ATTGATGGAT 1644
 GTCTTCTAGC TGCAGATGCC TCTGCGCACC AAGGAATGGA GAGGAGGGGA CCCATGTAAT 1704
 CCTTTTGTTT AGTTTGTGTT TTGTTTTTGT GTGAATGAGA AAGGTGTGCT GGTGATGGAA 1764
 TGGCAGGTGT CATATGACTG ATTACTCAGA GCAGATGAGG AAACTGTAG TCTCTGAGTC 1824
 CTTTGCTAAT CGCAACTCTT GTGAATTATT CTGATTCTTT TTTATGCAGA ATTTGATTCTG 1884
 TATGATCAGT ACTGACTTTC TGATTACTGT CCAGCTTATA GTCTTCCAGT TTAATGAACT 1944
 ACCATCTGAT GTTTCATATT TAAGTGTATT TAAAGAAAAT AAACACCATT ATTCAAGTCT 2004

配列番号 : 3

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys

1 5 10 15

配列番号 : 4

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGGGATGGGG AACTTGAAC GCTGAAT

27

配列番号 : 5

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATCTAATCC AGCACCCCAA AAATGC

27

配列番号 : 6

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

配列番号 : 7

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTGGTTCGGC CCAGAACTTG GAACGCTGAA TCA

33

配列番号 : 8

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCGCTCGCC CACTAATACG ACTCACTATA GG

32

配列番号 : 9

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AATTAACCCT CACTAAAGGG

20

配列番号 : 10

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCAGGGTTTT CCCAGTCACG AC

22

配列番号 : 11

配列の長さ :

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

配列番号 : 12

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AAGTCTGGAG ACCTGCT

17

配列番号 : 13

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGCAGGTCT CCAGACT

17

配列番号 : 14

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGCACCCAAG GAATGGA

17

配列番号 : 15

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGACACCTGG CCATTCCA

18

配列番号 : 16

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CATCAGATGG TAGTTCAT

18

配列番号 : 17

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATGCTGAGCG AGAGTCCATA

20

配列番号 : 18

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CACTAGGTTT GCGGCAACTT

20

配列番号 : 19

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTGTTGGCA AGCACTTACA

20

配列番号 : 20

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATCCATCCA GATCCCTGAA

20

配列番号 : 21

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGATCAGGG CTGCTTCTA

19

配列番号 : 22

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCCAGATCTT TTGCGGCAAC TTTCTATGAC AT

32

配列番号 : 23

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGGTCGACT CAAACAGGCA CTAATTCAGG TAC

33

配列番号 : 24

配列の長さ : 1581

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : マウス

組織の種類 : 肺(lung)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 96..1169

特徴を決定した方法 : E

配列

TTCCGGGCTT TGCTGGAGAA TGCCTTTTGC AACACTTTTC AGTAGCTGCC TGGAAACAAC	60
TGCTTAGTCA TCGGTAGACA TTAAAAATAT TCAAA ATG TAT GGA GAA TGG GGA	113
Met Tyr Gly Glu Trp Gly	
1 5	
ATG GGG AAT ATC CTC ATG ATG TTC CAT GTG TAC TTG GTG CAG GGC TTC	161
Met Gly Asn Ile Leu Met Met Phe His Val Tyr Leu Val Gln Gly Phe	
10 15 20	
AGG AGC GAA CAT GGA CCA GTG AAG GAT TTT TCT TTT GAG CGA TCA TCC	209
Arg Ser Glu His Gly Pro Val Lys Asp Phe Ser Phe Glu Arg Ser Ser	
25 30 35	
CGG TCC ATG TTG GAA CGA TCT GAA CAA CAG ATC CGA GCA GCT TCT AGT	257
Arg Ser Met Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser	
40 45 50	
TTG GAG GAG TTG CTG CAA ATC GCG CAC TCT GAG GAC TGG AAG CTG TGG	305
Leu Glu Glu Leu Leu Gln Ile Ala His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp	
55 60 65 70	
CGA TGC CGG TTG AAG CTC AAA AGT CTT GCC AGT ATG GAC TCA CGC TCA	353
Arg Cys Arg Leu Lys Leu Lys Ser Leu Ala Ser Met Asp Ser Arg Ser	
75 80 85	
GCA TCC CAT CGC TCC ACC AGA TTT GCG GCA ACT TTC TAT GAC ACT GAA	401
Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Thr Glu	

90	95	100	
ACA CTA AAA GTT ATA GAT GAA GAA TGG CAG AGG ACC CAA TGC AGC CCT			449
Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro			
105	110	115	
AGA GAG ACA TGC GTA GAA GTC GCC AGT GAG CTG GGG AAG ACA ACC AAC			497
Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Thr Thr Asn			
120	125	130	
ACA TTC TTC AAG CCC CCC TGT GTA AAT GTC TTC CGG TGT GGA GGC TGC			545
Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys			
135	140	145	150
TGC AAC GAA GAG GGT GTG ATG TGT ATG AAC ACA AGC ACC TCC TAC ATC			593
Cys Asn Glu Glu Gly Val Met Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile			
155	160	165	
TCC AAA CAG CTC TTT GAG ATA TCA GTG CCT CTG ACA TCA GTG CCC GAG			641
Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu			
170	175	180	
TTA GTG CCT GTT AAA ATT GCC AAC CAT ACG GGT TGT AAG TGC TTG CCC			689
Leu Val Pro Val Lys Ile Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro			
185	190	195	
ACG GGC CCC CGC CAT CCT TAC TCA ATT ATC AGA AGA TCC ATT CAG ACC			737
Thr Gly Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Thr			
200	205	210	
CCA GAA GAA GAT GAA TGT CCT CAT TCC AAG AAA CTC TGT CCT ATT GAC			785
Pro Glu Glu Asp Glu Cys Pro His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp			
215	220	225	230
ATG CTG TGG GAT AAC ACC AAA TGT AAA TGT GTT TTG CAA GAC GAG ACT			833

Met Leu Trp Asp Asn Thr Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Asp Glu Thr	
235 240 245	
CCA CTG CCT GGG ACA GAA GAC CAC TCT TAC CTC CAG GAA CCC ACT CTC	881
Pro Leu Pro Gly Thr Glu Asp His Ser Tyr Leu Gln Glu Pro Thr Leu	
250 255 260	
TGT GGA CCG CAC ATG ACG TTT GAT GAA GAT CGC TGT GAG TGC GTC TGT	929
Cys Gly Pro His Met Thr Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys	
265 270 275	
AAA GCA CCA TGT CCG GGA GAT CTC ATT CAG CAC CCG GAA AAC TGC AGT	977
Lys Ala Pro Cys Pro Gly Asp Leu Ile Gln His Pro Glu Asn Cys Ser	
280 285 290	
TGC TTT GAG TGC AAA GAA AGT CTG GAG AGC TGC TGC CAA AAG CAC AAG	1025
Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Ser Cys Cys Gln Lys His Lys	
295 300 305 310	
ATT TTT CAC CCA GAC ACC TGC AGC TGT GAG GAC AGA TGT CCT TTT CAC	1073
Ile Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His	
315 320 325	
ACC AGA ACA TGT GCA AGT AGA AAG CCA GCC TGT GGA AAG CAC TGG CGC	1121
Thr Arg Thr Cys Ala Ser Arg Lys Pro Ala Cys Gly Lys His Trp Arg	
330 335 340	
TTT CCA AAG GAG ACA AGG GCC CAG GGA CTC TAC AGC CAG GAG AAC CCT	1169
Phe Pro Lys Glu Thr Arg Ala Gln Gly Leu Tyr Ser Gln Glu Asn Pro	
345 350 355	
TGATTCAACT TCCTTTCAAG TCCCCCATC TCTGTCATTT TAAACAGCTC ACTGCTTTGT	1229
CAAGTTGCTG TCACTGTTGC CCACTACCCC TGCCCCCCCC CCCCCCGCC TCCAGGTGTT	1289
AGAAAAGTTG ATTTGACCTA GTGTCATGGT AAAGCCACAT TTCCATGCAA TGGCGGCTAG	1349

GTGATTCCCC AGTTCCTGA CAAATGACTT GTAGCTTCAA ATGTCTTTGC GCCATCANCA 1409
 CTCAAAAAGG AAGGGGTCTG AAGAACCCTT TGTTTGATAA ATAAAAACAG GTGCCTGAAA 1469
 CAAAATATTA GGTGCCACTC GATTGGGTCC CTCGGGCTGG CCAAATTCCA AGGGCAATGC 1529
 TCCTGAATTT ATTGTGCCCC TTCCTTAATG CGGAATTTCC TTTGTTTGA TT 1581

配列番号 : 25

配列の長さ : 1491

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラット

組織の種類 : 肺(lung)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 270..1247

特徴を決定した方法 : E

配列

GCCACCTCTT GATTATTTGT GCAGCGGGAA ACTTTGAAAT AGTTTTTCATC TCTTTCTCCC 60
 ATACTAAGAT TGTGTGTGGC CGTGGGGGAG TCCTTGACTA ACTCAAGTCA TTTCAATTGGA 120
 TTTTGATTAC AACTGATCAT GTGATATTTT TTTCCATGTA AAGTTTTGGG GCTTCAAAC 180
 TTGCTTCTGG AGAATGCCTT TTGCAACACT TTTCACTAGC TGCCTGGAAA CAACTGCTTA 240
 GCCATCAGTG GACATTTGAA ATATTCAAA ATG TAT GGA GAG TGG GCC GCA GTG 293

Met Tyr Gly Glu Trp Ala Ala Val

AAT ATT CTC ATG ATG TCC TAT GTG TAC CTG GTG CAG GGC TTC AGT ATT	341
Asn Ile Leu Met Met Ser Tyr Val Tyr Leu Val Gln Gly Phe Ser Ile	
10 15 20	
GAA CAC CGA GCA GTG AAG GAT GTT TCT CTT GAG CGA TCA TCC CGG TCT	389
Glu His Arg Ala Val Lys Asp Val Ser Leu Glu Arg Ser Ser Arg Ser	
25 30 35 40	
GTG TTG GAA CGT TCT GAA CAA CAG ATC CGC GCG GCT TCT ACT TTG GAA	437
Val Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Thr Leu Glu	
45 50 55	
GAG TTG CTG CAA GTC GCA CAC TCT GAG GAC TGG AAG CTG TGG CGG TGC	485
Glu Leu Leu Gln Val Ala His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg Cys	
60 65 70	
CGG TTG AAG CTT AAA AGT CTT GCC AAT GTG GAC TCG CGC TCA ACA TCC	533
Arg Leu Lys Leu Lys Ser Leu Ala Asn Val Asp Ser Arg Ser Thr Ser	
75 80 85	
CAT CGC TCC ACC AGA TTT GCG GCA ACT TTC TAT GAT ACT GAA ACA CTA	581
His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Thr Glu Thr Leu	
90 95 100	
AAA GTT ATA GAT GAA GAA TGG CAG AGG ACC CAA TGC AGC CCT AGA GAG	629
Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg Glu	
105 110 115 120	
ACA TGC GTA GAA GTC GCC AGT GAG CTG GGG AAG ACA ACC AAC ACA TTT	677
Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Thr Thr Asn Thr Phe	
125 130 135	
TTC AAG CCC CCT TGT GTA AAT GTC TTC CGG TGT GGA GGA TGC TGC AAT	725
Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn	

140	145	150	
GAA GAG AGC GTG ATG TGT ATG AAC ACA AGC ACC TCC TAC ATC TCC AAA			773
Glu Glu Ser Val Met Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser Lys			
155	160	165	
CAG CTC TTT GAG ATA TCA GTG CCT CTG ACA TCA GTG CCC GAG TTA GTG			821
Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu Val			
170	175	180	
CCT GTT AAA ATT GCC AAC CAT ACG GGT TGT AAG TGT TTG CCC ACG GGC			869
Pro Val Lys Ile Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr Gly			
185	190	195	200
CCC CGG CAT CCT TAT TCA ATT ATC AGA AGA TCC ATT CAG ATC CCA GAA			917
Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro Glu			
205	210	215	
GAA GAT CAA TGT CCT CAT TCC AAG AAA CTC TGT CCT GTT GAC ATG CTG			965
Glu Asp Gln Cys Pro His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Val Asp Met Leu			
220	225	230	
TGG GAT AAC ACC AAA TGT AAA TGT GTT TTA CAA GAT GAG AAT CCA CTG			1013
Trp Asp Asn Thr Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Asp Glu Asn Pro Leu			
235	240	245	
CCT GGG ACA GAA GAC CAC TCT TAC CTC CAG GAA CCC GCT CTC TGT GGA			1061
Pro Gly Thr Glu Asp His Ser Tyr Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys Gly			
250	255	260	
CCA CAC ATG ATG TTT GAT GAA GAT CGC TGC GAG TGT GTC TGT AAA GCA			1109
Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys Ala			
265	270	275	280
CCA TGT CCT GGA GAT CTC ATT CAG CAC CCG GAA AAC TGC AGT TGC TTT			1157

Pro Cys Pro Gly Asp Leu Ile Gln His Pro Glu Asn Cys Ser Cys Phe
 285 290 295
 GAA TGC AAA GAA AGT CTG GAA AGC TGT TGC CAA AAG CAC AAG ATG TTT 1205
 Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Ser Cys Cys Gln Lys His Lys Met Phe
 300 305 310
 CAC CCT GAC ACC TGC AGA TCA ATG GTC TTT TCA CTG TCC CCT 1247
 His Pro Asp Thr Cys Arg Ser Met Val Phe Ser Leu Ser Pro
 315 320 325
 TAATTTGGTT TACTGGTGAC ATTTAAAGGA CATACTAACC TGATTTATTG GGGCTCTTTT 1307
 CTCTCAGGGC CCAAGCACAC TCTTAAAGGA ACACAGACGT TTGGCCTCTA AGAAATACAT 1367
 GGAAGTATTA TAGAGTGATG ATTAAATTGT CTTCTTGTTT CAAACAGGGT CTCATGATTA 1427
 CAGACCCGTA TTGCCATGCC TGCCGTCATG CTATCATGAG CGGAAAAGAA TCACTGGCAT 1487
 TTAA 1491

配列番号 : 26

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTGCGAGTG TGTCTGTAAA 20

配列番号 : 27

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

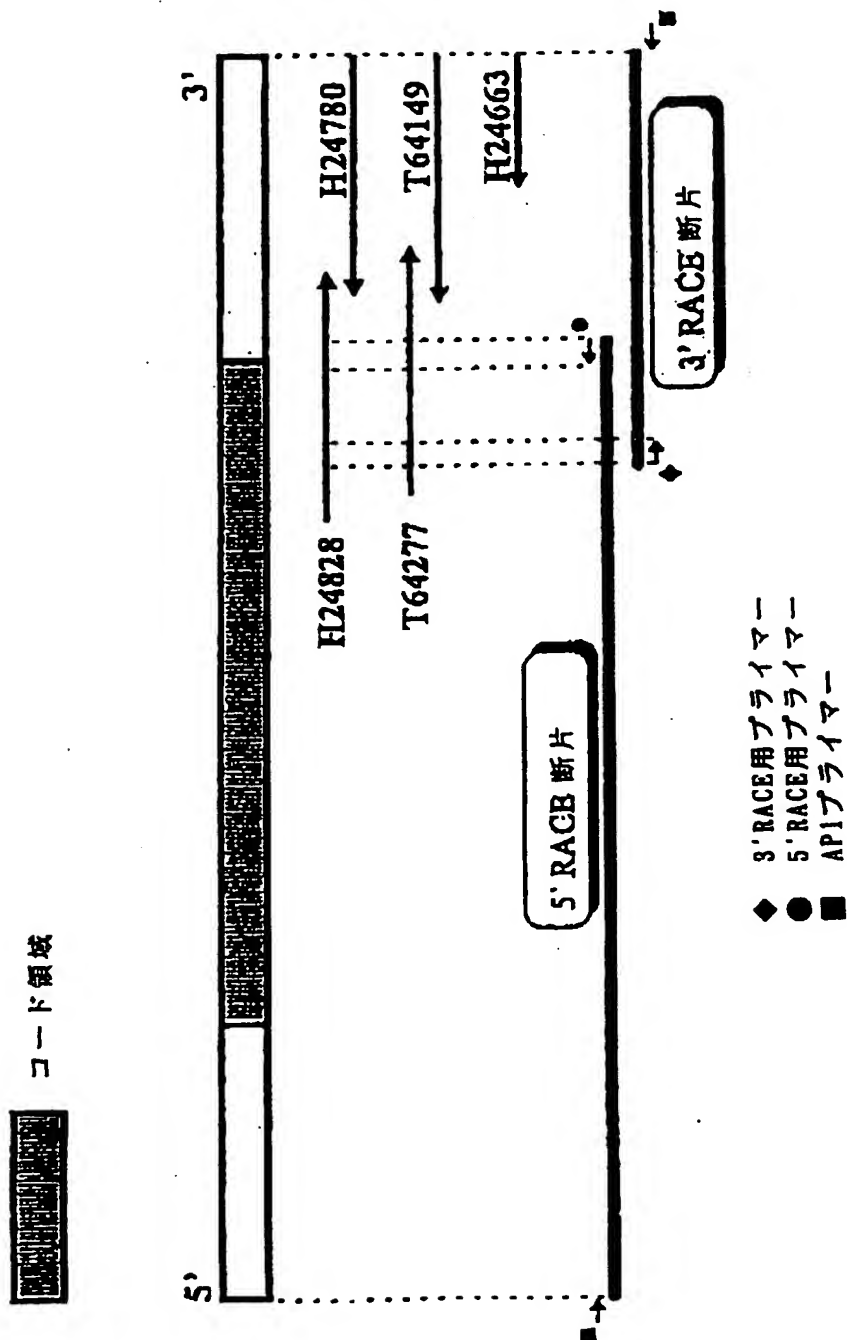
配列

GGGTAGTGGG CAACAGTGAC AGCAA

請求の範囲

1. 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質。
3. 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNA。
5. 請求項3または4に記載のDNAを含むベクター。
6. 請求項5に記載のベクターを保持する形質転換体。
7. 請求項6に記載の形質転換体を培養することを特徴とする、請求項1または2に記載のタンパク質の生産方法。
8. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する抗体。
9. 請求項1または2に記載のタンパク質と被検サンプルとの結合活性を検出する工程を含む、請求項1または2に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法。
10. 請求項9に記載の方法により単離される、請求項1または2に記載のタンパク質に結合する化合物。

図 1



2 / 4

☒ 2

HSVEGFCC*	MHLLGFFSVA	CSLLAAALLP	GPREAPAAAA	AFESGLDLS	AEPDAGEATA	50
H24828	-----	-----	-----	-----	-----	50
HSVEGFCC	YASKDLEEQL	RSVSSVDELM	TVLYPEYWKM	YKQLRKGGW	QHNREQANLN	100
H24828	-----	-----	-----	-----	-----	100
HSVEGFCC	SRTEETIKFA	AAHYNTEILK	SIDNEWRTQ	CMPREVCIDV	GKEFGVATNT	150
H24828	-----	-----	-----	-----	-----	150
HSVEGFCC	FFKPPCVSVY	RCGGCCNSEG	LQCMNTTSY	LSKTLFEITV	PLSQGPKPVT	200
H24828	-----	-----	-----	-----	-----	200
HSVEGFCC	ISFANHTSCR	CMSKLDVYRQ	VHSIIRSLP	ATLPQCQAAN	KTCPTNYMWN	250
H24828	-----	-----	-----	-----	-----	250
HSVEGFCC	NHICRCLAE	DFMFSSDAGD	DSTDGFHDIC	GPNKELDEET	CQCVCRAGLR	300
H24828	-----	-----	-----	-----	-----HLQE	300
HSVEGFCC	PASCGPIKEL	DRNSQCVCH	NKLFPSQCGA	NREFDENTQ	CVCKRTPRN	350
H24828	PALCGPIIMMF	EDRQECVCH	TPCPKDLIQH	PKNCSCFEK	ESLETCKKH	350
HSVEGFCC	QPLNPGKCA	CTESPQKCL	LKGKKFHHQT	SCYRRPCTN	ROKAC-EPGF	400
H24828	KLFHDTESL	-----	-----DR	PFHTRPCAS	GKTACAKHCR	400
HSVEGFCC	SYSVEVCRV	SYWRRQMS	450
H24828	FPKIKRAAQG	HSRNN...	450

*HSVEGFCC:

human VEGF-C

3 / 4

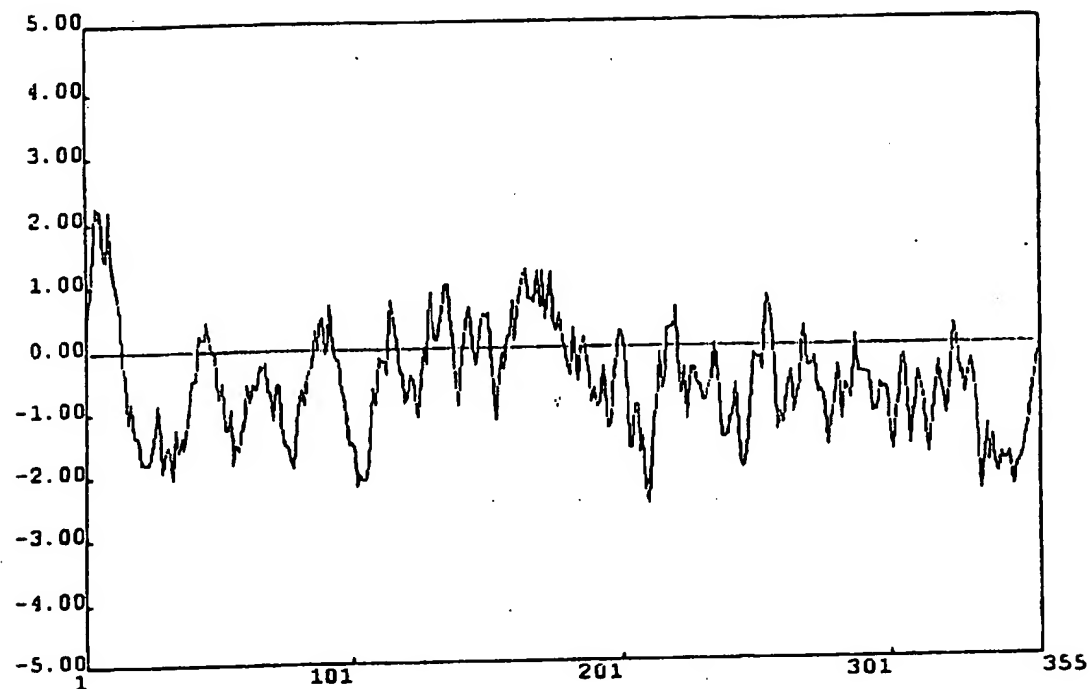
[X] 3

HSVEGF-D	YREWVVNV	FMMIYVQ	GSSNEHGPVK	-----RSSQ	50
HSVEGF-C	HLGGFESVA	CSLAAALP	GPREAPAAAA	AFESGLDLSO AEPDAGEATA	50
HSPDGF-A	RTACLL	GCGYLAHVA	EEAEIPREVI	ERLAR-----SQ	50
HSPDGF-B	NRCWAF	LCCYRLVSA	EGDPIEELY	EMLSD-----HS	50
HSPIGF2	PVMRLPCF	LQLAGLAP	AVPPQWALS	AGNGS-----	50
HSVEGF	NFLSWVHW	SLALYTHH	AKWSQAAPHA	EGGGQ-----	50
HSVEGF-B	SPILRR---	--LAAALQ	LAPAGPVSQ	PDAPG-----	50
HSVEGF-D	STIERSECI	RAASSLELL	RITHSDWHL	WRRLRLKSF	100
HSVEGF-C	YAKDLEFOI	RSVSSVDLM	TVYPEYWM	YKQLPKGGW	100
HSPDGF-A	IHSIRDLRI	LEIDSVGED	S-----	-----DTSLRA	100
HSPDGF-B	IRFDDLRI	LHGDPGEIDG	AE-----	-----DLNMTR	100
HSPIGF2	-----	-----	-----	-----	100
HSVEGF	-----	-----	-----	-----	100
HSVEGF-B	-----	-----	-----	-----	100
HSVEGF-D	RST---RFA	ATFYDIETL	VIDEEWOTQ	CSPRETCHEV	150
HSVEGF-C	SRTEEIKFA	AAHYNTIL	SIDNEWKTO	CMPEVCI DV	150
HSPDGF-A	HGVHAKHVP	EKRPLIRR	RSIEEAVPAV	CKIRTVIYEI	150
HSPDGF-B	SHSGGELESL	ARGRRSLGSL	TIAEPAMIAE	CKTRTEVEEI	150
HSPIGF2	-----	SEV-VVP	FOEV-WGGSY	CRALRLVDV	150
HSVEGF	-----	NHH-VVP	FMDV-YQPSY	CHPTLVDI	150
HSVEGF-B	-----	HQRKVVVS	WIDV-YTAT	QPRIVVPL	150
HSVEGF-D	FE--KPPCVN	YRCGGCCNE	ESIEMNIST	SYISKLFEEI	200
HSVEGF-C	FE--KPPCVS	YRCGGCCNS	UGLOCMNIST	SYLSKTLFEI	200
HSPDGF-A	NLWPPCCE	YKRCIGCCNT	SSVKQPSRV	HHRSVKAKV	200
HSPDGF-B	NLWPPCCE	VORCGGCCNN	RNVQCRPIQV	QLRPVCRKI	200
HSPIGF2	ME--SPSCVS	LLRCIGCCND	NIHSPVET	ANVTMLLKI	200
HSVEGF	IL--KPSVCP	LMRCGGCCND	EGLEVPTEE	SNITMIMRI	200
HSVEGF-B	QL--VPSCVT	VORCGGCCPD	DGLEVPTEI	HQVRMILM	200
HSVEGF-D	LPVKVANHT	GKGLLT--A	PRHPYSIIR	SIQIPEEDC	250
HSVEGF-C	PTISFANHT	SRRMSKLDV	YRQVHSIIR	S-LPATLPDC	250
HSPDGF-A	EQVRLLEEHL	EACATTSLN	PDYREEDTG	P-RESGKPK	250
HSPDGF-B	KATVTLEDHL	AKKET-VAA	ARPVTRSPG	S-QEORAH	250
HSPIGF2	YBELTFSQIV	RCEGR----	LREKMKPER	R-PKGRGKR	250
HSVEGF	IGEMSFLQAN	KCEGR--KKD	RARQEKKS	G-KGKGOKK	250
HSVEGF-B	LGEMSLEES	QCEGRPKKKD	SA-----	-----	250
HSVEGF-D	MLWDSNKKK	VLDDE-NPLA	GTEHSHLQE	-----	300
HSVEGF-C	YMNHNHIGRC	LAQEDFKFS	DAGDDSTDGF	HDICGPNKEL	300
HSPDGF-A	-----	-----	-----	-----	300
HSPDGF-B	-----	-----	-----	-----	300
HSPIGF2	-----	-----	-----	-----	300
HSVEGF	-----	-----	-----	-----	300
HSVEGF-B	-----	-----	-----	-----	300
HSVEGF-D	----PALCP	MMEDEDRCE	VCTPCPKD	LQHPKNCSC	350
HSVEGF-C	AGLRPASCP	KEIDRNSQ	VCTNKFPS	QCGANREFDE	350
HSPDGF-A	-----	-----	-----	-----	350
HSPDGF-B	VRVRRPPK	IRKFKHTDK	TALDETGA	-----	350
HSPIGF2	-----	-----	-----	-----	350
HSVEGF	N-TDSRCKAR	OLENERTCR	OKPRR...	-----	350
HSVEGF-B	RRSFLRCGR	GLEINPDTGR	OKLRR...	-----	350
HSVEGF-D	CCQKHKFHD	DTSCSE---	-----	-----	400
HSVEGF-C	GPRNQI--NE	GKACICTES	PQKCLLKGGK	FHHQTCSYR	400
HSPDGF-A	-----	-----	-----	-----	400
HSPDGF-B	-----	-----	-----	-----	400
HSPIGF2	-----	-----	-----	-----	400
HSVEGF	-----	-----	-----	-----	400
HSVEGF-B	-----	-----	-----	-----	400
HSVEGF-D	AKHCRFPK	RAAQGHSR	N...	-----	450
HSVEGF-C	-EPGFSYS	VCRCVSYW	R...	-----	450
HSPDGF-A	-----	-----	-----	-----	450
HSPDGF-B	-----	-----	-----	-----	450
HSPIGF2	-----	-----	-----	-----	450
HSVEGF	-----	-----	-----	-----	450
HSVEGF-B	-----	-----	-----	-----	450

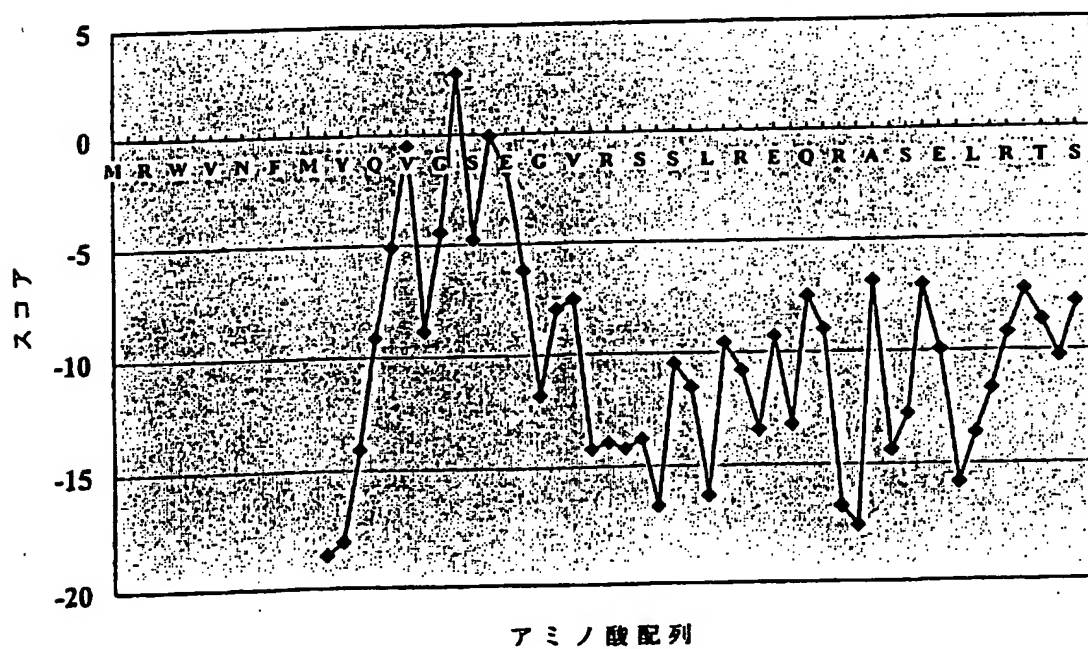
4 / 4

図 4

a) 疎水性



b) ヒトVEGF-Dのシグナルペプチドの予測



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/18, C12N15/63, C12P21/02, C07K14/485, C07K16/22,
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/18, C12N15/63, C12P21/02, C07K14/485, C07K16/22,
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GENETYX-MAC/CD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Yamada, Y. et al. "Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D." Genomics (1997, Jun.), Vol. 42, No. 3, p. 483-488	1 - 10
X	Vladimir, J. et al. "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases" EMBO J. (1996, Jan.) Vol. 15, No. 2, p. 290-298	1 - 2
X	Vladimir, J. et al. "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases" EMBO J. (1996, Jan.) Vol. 15, No. 7, p. 1751	1 - 2
PX	Maurizio, O. et al. "Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996, Oct.) Vol. 93, p. 11675-11680	1 - 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 7, 1997 (07. 10. 97)

Date of mailing of the international search report

October 21, 1997 (21. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02456

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Georg. B. et al. "Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation" Development (1992) Vol. 114, p. 521-532	1 - 10
X	David, T.S. et al. "The mouse gene for vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1996, Feb.) Vol. 271, No. 7, p. 3877-3883	1 - 10
X	Kevin, P.C. et al. "Vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1992) Vol. 267, No. 23, p. 16317-16322	1 - 10
X	Greg, C. et al. "Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) Vol. 87, p. 2628-2632	1 - 10
X	Edmund, T. et al. "The human gene for vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1991) Vol. 266, No. 18, p. 11947-11954	1 - 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02456

Disclosure other than written disclosures

1. The GenBank Database (Rel. 100) on GENETYX, Accession No. D89628, Yoshiki Yamada, Chugai Research Institute for Molecular Medicine. (29-Nov-1996)
2. The GenBank Database (Rel. 100) on GENETYX, Accession No. T64277, Hillier, L. et al. (1995)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N15/18, C12N15/63, C12P21/02, C07K14/485, C07K16/22, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N15/18, C12N15/63, C12P21/02, C07K14/485, C07K16/22, G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GENETYX-MAC/CD		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Yamada, Y et al. "Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D." Genomics (1997, Jun.) 第42巻 第3号 p. 483-488	1-10
X	Vladimir, J. et al. "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases" EMBO J. (1996, Jan.) 第15巻 第2号 p. 290-298	1-2
X	Vladimir, J. et al. "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases" EMBO J. (1996, Jan.) 第15巻 第7号 p. 1751	1-2
PX	Maurizio, O. et al. "Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996, Oct.) 第93巻 p. 11675-11680	1-2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07. 10. 97	国際調査報告の発送日 21.10.1997
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平田 和男 印	4 B 9549
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Georg, B. et al. "Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation" Development (1992) 第114巻 p. 521-532	1-10
X	David, T. S. et al. "The mouse gene for vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1996, Feb) 第271巻 第7号 p. 3877-3883	1-10
X	Kevin, P. C. et al. "Vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1992) 第267巻 第23号 p. 16317-16322	1-10
X	Greg, C. et al. "Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 第87巻 p. 2628-2632	1-10
X	Edmund, T. et al. "The human gene for vascular endothelial growth factor" J. Biol. Chem. (1991) 第266巻 第18号 p. 11947-11954	1-10

書面による開示以外の開示

1. The GenBank Database (Rel.100) on GENETYX, Accession No. D89628, Yoshiki Yamada, Chugai Research Institute for Molecular Medicine. (29-Nov-1996)
2. The Genbank Database (Rel.100) on GENETYX, Accession No. T64277, Hillier, L. et al. (1995)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.